

⑧ 公表 平成1年(1989)11月9日

⑨ Int. Cl. ⁴	⑩ 発明の名称	⑪ 特 許 昭63-502334	⑫ 特許文提出日 昭63(1988)12月8日
C 12 N 15/00	⑬ 発明の名称	⑭ 出 願 昭63(1988)4月8日	⑮ 出 願 出 願 PCT/GB88/00276
C 12 P 21/00	⑯ 発明の名称	⑰ 出 願 昭63(1988)10月20日	⑱ 出 願 出 願 WO88/08027
			⑲ 出 願 出 願 昭63(1988)10月20日

② 発明の名称 酵母ベクター

③ 優先権主張 ④ 1987年4月9日 ⑤ イギリス (GB) ⑥ 8708495

⑦ 発 明 者 ヒンクリツフエ, エドワード イギリス国 ノッティンガムシャー, パートン ジョーエル, ラムプ
リイ レーン 16

⑧ 出 願 人 デルタ バイオテクノロジー イギリス国 エヌジー7 1 エフデュー, ノッティンガム, コース
リミテッド ル プールバード, コースル コート (番地なし)

⑨ 代 理 人 井理士 浅 村 皓 外3名

⑩ 指 定 国 AT(広域特許), AU, BE(広域特許), BR, CH(広域特許), DE(広域特許), DK, FI, FR(広域特
許), GB, GR(広域特許), HU, IT(広域特許), JP, KR, LU(広域特許), NL(広域特許), SE(広域
特許)

最終頁に続く

図 表 の 説 明

1. 組換えによって生じられる DNA 配列、その 1 対が同じ方向性を有し他の 2 対が逆の方向性を有する 3 個の 2 μm PLP 組換え部位、及び目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含むベクターであつて、上記組換えによつて生じられる DNA 配列が上記同じ方向性を有する 1 対の 2 μm PLP 組換え部位の間にある 2 μm プラスミドベクター。

2. 選択マーカー DNA 配列を含む請求の範囲第 1 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

3. (i) バクテリア宿主中でのベクターの増殖に必要なバクテリアプラスミド DNA 配列; (ii) エキストラ 2 μm PLP 組換え部位; (iii) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列; 及び細菌形質転換用の選択マーカー DNA 配列を保持する完全 2 μm プラスミドであつて、2 μm プラスミドの 2 つの逆方向複製配列の 1 つの配列内の組換え部位に上記バクテリアプラスミド DNA が存在し且つ上記エキストラ PLP 組換え部位が作られており、上記エキストラ PLP 組換え部位は上記逆方向複製配列の 1 つの配列内の内因性 PLP 組換え部位に対して同じ方向性を有しており、上記バクテリアプラスミド DNA 配列はエキストラ PLP 組換え部位と上記逆方向複製配列の 1 つの配列内の内因性 PLP 組換え部位との間にある完全 2 μm プラスミドを含む請求

の範囲第 2 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

4. 上記制限酵素部位が EcoRI 部位である請求の範囲第 3 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

5. 全てのバクテリア DNA 配列が上記のようにエキストラ PLP 組換え部位と内因性 PLP 組換え部位との間にある請求の範囲第 3 項又は第 4 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

6. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列が酵母に対して毒性である請求の範囲第 1 項から第 5 項のいずれか 1 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

7. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列が、HSA をコードする DNA 配列であつて、該 DNA 配列はその 5'末端が酵母において機能する分泌リーダー配列を介して酵母において機能する信号子プロセッサーと融合しており、その 3'末端が酵母において機能する転写ターミネーションシグナルに結合している請求の範囲第 6 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

8. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列が、その 3'末端が OAL / UYCI3x2 OAL / PGZ ハイブリッドプロモーターと融合しておりその 3'末端が酵母において機能する転写ターミネーションシグナルに結合している MGT - HSA 遺伝子である請求の範囲第 6 項記載の 2 μm プラスミドベクター。

9. 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする遺伝子が、DEX-遺伝子、あるいは、その末端塩基が酵母において機能する分断リーダー配列を介して酵母において機能する遺伝子プロモーターに融合しておりその末端塩基が酵母において機能する転写ターミネーションシグナルに融合している *Escherichia coli* の ϕ -gal カナーゼをコードする DNA 配列である請求の範囲第 1 項から第 8 項のいずれか 1 項記載の 2 μ プラスミドベクター。

10. 微付した第 9 項の pSAC3 の配置を実質的に有する請求の範囲第 1 項記載の 2 μ プラスミドベクター。

11. 請求の範囲第 1 項から第 9 項のいずれか 1 項記載の 2 μ プラスミドベクターの製造法であつて、
(i) 酵母形質転換を遂行するための DNA 配列；(ii) 目的とする蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列；及び (iii) (a) パクテリア内でのベクターの増殖を可能にするパクテリアプラスミド DNA と (b) FLP 認識部位のエレメントを含む挿入用 DNA 配列を、ユカストラ FLP 認識部位がベクター内に作成され且つ互に逆の方向性を有する 2 つの FLP 認識部位の間に上記パクテリアプラスミド DNA がはさまれるように、挿入用 DNA 配列を完全 2 μ プラスミドに挿入することを含む上記の製造法。

12. 上記挿入用 DNA 配列を内源性 FLP 認識部位の ユニーク Xba I 部位に挿入し、挿入用 DNA 配列の一

方の末端に 2 μ プラスミドの複製配列の 1 部を有し、他方の末端に 2 μ プラスミドの複製配列の残りの部分を有する請求の範囲第 1 項記載の製造法。

13. 酵母に列して両側の蛋白質又はペプチドをコードする DNA 配列を含む、パクテリア DNA は含まない 2 μ プラスミドベクター。

14. 請求の範囲第 1 項から第 9 項のいずれか 1 項又は第 1 3 項記載の 2 μ プラスミドベクターで形質転換された発酵用酵母又は発酵用酵母。

15. 請求の範囲第 1 4 項記載の酵母を発酵することによつて得られる目的とする蛋白質又はペプチド。

16. 目的とする遺伝子が *Sac. B* 1 部位に置換時又は論議的に挿入されている 2 μ プラスミドベクター。

明 細 書

酵母ベクター

本発明は、酵母、特に *Saccharomyces cerevisiae* の遺伝子工学に関する。

形質転換と書かれる工程によつて、異種 DNA が酵母細胞に取込まれ、次いで遺伝的に継承されて該 DNA の発現が行なわれる。形質転換についての最初の報告は 1970 年代の前半に行なわれ、その時の形質転換は、酵母の細胞壁を酵素的作用によつて除いてプロトプラストを得、これに DNA を加える方法を用いるものであつた (Hinnen et al., 1978; Bogg, 1978)。最近ではインダクト酵母細胞を用いた形質転換が証明されている (Hise et al., 1983)。

酵母は適当なプラスミドを用いて形質転換することができ、この目的のために通常、“シヤトルベクター”として構築されたプラスミドが使用されており、このシヤトルベクターは *Escherichia coli* あるいは酵母のいずれにおいても増殖することができる (Hinnen et al., 1978; Bogg, 1978; Strubel et al., 1979)。

pBR 3.2.2 (Bolivar, 1978) などの *E. coli* プラスミド DNA 配列が *E. coli* 中に取込まれることによつて *E. coli* 中でのベクター DNA の量産が促進され、そ

の結果酵母の形質転換を効率よく行なうことができる。

酵母形質転換に一般的に使用されているプラスミドベクターは次の 2 つに大別される。即ち、(i) DNA 複製オリジンを有しているために、クロモソーム DNA に依存することなく自己を維持することが出来る複製ベクター；及び (ii) クロモソーム DNA と組換えを遂行し、宿主細胞中の組換え DNA として複製し自己を維持するインテグレートベクターの 2 つである。複製ベクターは更に、(a) 酵母の同値 2 μ プラスミドから得られる DNA 複製オリジンを含む 2 μ 由来プラスミドベクター；(b) 酵母のクロモソーム DNA から得られる見掛けの複製オリジンを含む自己複製ベクター；及び (c) 上記の DNA 複製オリジンの 1 つを更にセントロメアを含むことが知られている酵母クロモソーム DNA 配列を有するセントロメアプラスミド (CEM) に分けられる。

上記したベクターで有効に酵母を形質転換するためには、組換え DNA を保持する形質転換体を同定して選択することが必要である。この選択は、ベクター DNA 内に検別可能な表現型を有する遺伝子を導入することによつて達成される。実験室で酵母を形質転換するのに使用するベクターの場合には、LEU 2⁺、URA 3⁺、TRP 1⁺ (Hinnen et al., 1978; Bogg, 1978; Gerbaud et al., 1979) などの原栄養性遺伝子が通常使用され、これらは宿主の栄養要求性における欠損を補補するように作用する。しかしながら、発酵用

酵母及び他の工業用途に用いられる酵母はしばしば倍体であるため栄養要求性を示さず、従つて強力な選択遺伝子に基づいた選択系を利用することが必要である。この点に関連して、各種の対価を発揮する遺伝子を保持した2 μ m 由来複製プラスミドベクターが報告されている。即ち、110418 (Jimenez et al., 1980; Webster et al., 1983)、ハイドロマイシンB (Orr et al., 1983)、クロラムフェニコール (Cohen et al., 1980; Hedfied et al., 1984)などの抗生物質に対して；及び菌感染剤スルホニルメチンメチル (Folco et al., 1985)、コンパチン (Kido et al., 1983)、類 (Hedderon et al., 1985)などの他の毒性物質に対して阻害を発揮する遺伝子を用いた例がある。

酵母中で組換え遺伝子が安定に継承されるか否かは、形質転換に用いた酵母ベクターのタイプに依っている。前記した2つのタイプのベクターのうちで安定なベクターはインテグレートベクターである。酵母のインテグレート形質転換の原理及び実験については文献 (Botstein & Davis, 1982; Wiesten et al., 1983; Orr - Weaver et al., 1983; Botstein, 1983)に記載されている。一般にインテグレート形質転換は比較的に効率が低く、菌懸液インテグレートプラスミドの場合にはDNA 1 μ g 当り約1-10個の形質転換体を得られることが報告されている

プラスミドは細胞1個当り1又は2コピーの割合いで存在し (Clarke & Carbon, 1978), 1世代当りわずかに1%が失われるにすぎない (Walmsley et al., 1983)。よって2 μ m 由来プラスミドは、宿主の失及び該プラスミド中に存在する2 μ m DNA 配列に依つて宿主の程度の遺伝的安定性を示す。

2 μ m プラスミドは細胞の核に存在していることが知られている (Nelson & Fungo, 1979; Livingston & Hane, 1979; Selley et al., 1980; Takeo et al., 1980; Sigurdson et al., 1981)が、メンデルの方法のように遺伝させない (Livingston, 1977)。2 μ m プラスミドを持たない細胞 (cero) が、細胞1当り2 μ m プラスミドの平均コピー数が50である半数体酵母集団から1世代当り0.001% 0.01%の割合いで発生することが示されている (Fletcher & Cox, 1983)。このような低レベルの遺伝的不安定性の原因を説明するものとして、2 μ m プラスミドは通常の成長条件下で細胞に対して何んらの利点を有していないことが考えられる (Broach, 1981; Fletcher & Cox, 1983; Sigurdson et al., 1981)。しかしながら、2 μ m プラスミドを有している株について2 μ m プラスミドが成長速度に対してわずかながら効果を示していることが報告されている (Walmsley et al., 1983)。S. cerevisiae の各種の株を分析した所、発酵用酵母

(Mason et al., 1979; Hicks et al., 1979)しかしながら、酵母クロモソームDNAと相同性を有するアリー末端を持つ環状DNAは高い効率 (100-10000倍)で酵母を形質転換し、形質転換に用いたDNAは一般に複製部位に対して相同性を有する配列中に組み込まれる (Orr - Weaver et al., 1981)。従つて、適切な制限酵素を用いてベクターDNAを切断することによつて、形質転換の効率を高め、クロモソームのインテグレート部位を定めることが可能である。形質転換の効率が十分に高く、かつクロモソーム内に組み込まれるターゲットDNA配列が、宿主細胞の代償に必須の遺伝子内に組み込まれない場合には、発酵用酵母の遺伝子的モディファイケーションにインテグレート形質転換を用いることができる。最近、発酵用酵母に用いるインテグレート酵母ベクターについて報告されている (Yocum, 1985)。

インテグレートベクターは選択を受けずに遺伝的に高率に不安定に継承されるが、複製ベクターはこれとは格違して不安定である。遺伝的に継承される安定性は用いる複製ベクターのタイプに依る。ARSプラスミドは高コピー数で存在し (細胞1個当り約20-50コピー)、より安定した傾向にあるが、1世代当り約10%以上の頻度で失われる (Kuznetsov, 1983)。しかしながら、ARSプラスミドの安定性はセントロメアが結合することによつて上昇する。セントロメア

(Tubb, 1980; Aigle et al., 1984; Hinebliffe & Daubney, 1984)などの酵母の株と一部の株に2 μ m プラスミドが存在していることが報告されている (Clark - Walker & Millon, 1974)。従つて、2 μ m プラスミドは常に存在しており、このことが本質的に高率の遺伝的安定性を有していることを示していると考えられている。

2 μ m プラスミドについての遺伝子分析及び分子分析の結果、2 μ m プラスミドの複製及び安定性に関して多くの情報が得られている (Volker & Broach, 1987)。本発明にはこのプラスミドは6318塩基対の環状DNA分子からなっている (Rattley & Develson, 1980)。そしてこのプラスミドはユニークな二方向性のDNA複製オリジンを有しており (Newlee et al., 1981)、これがすべての2 μ m 由来ベクターの必須成分となつている。2 μ m プラスミドは4つの遺伝子、即ちREP 1, REP 2, REP 3及びFLPを含んでおり、これらが細胞1個当りのコピー数を高く安定に維持するために必要とされている。REP 1とREP 2遺伝子はトランス作用蛋白質をコードしており、この蛋白質は、REP 3遺伝子座と相互に作用して溶けして機能を発揮し、細胞分裂の際に2 μ m プラスミドの分割が安定に行なわれるのを可能ならしめていていると考えられている (Volker & Broach, 1987)。この点に関して、REP 3遺伝子は、2 μ m プラスミド

の安定な分離を行なうシス作用遺伝子座として作用しており、 ϕ モザイクセントロメアと類似の複製型を有している (Jefferies et al., 1983; Kikuchi, 1983)。2 μ m プラズミドの複製形態は、2つの逆方向反復 DNA 配列 (それぞれ5'9'端対) が存在することであり、この配列によつて環状分子が2つのユニーク領域に分離されている。逆方向反復 DNA 配列の間で分子内組換えが起こり、一方のユニーク領域が他のユニーク領域に対して逆方向となり、A及びBと置かれるプラズミドの構造異性体が生じて *in vivo* で2つの異性体を有する混合集団が産生される (Boggs, 1978)。2つの逆方向反復配列間での組換えは、PLPと書われる遺伝子の産生蛋白質によつて仲介され、PLP蛋白質が逆方向反復領域内での高頻度の組換えを仲介することができる。この部位特異的組換えによつて、プラズミドコピー数の増幅が観察されていると考えられている (Futcher, 1986; Volkert & Breach, 1986; Som et al., 1986; Murray et al., 1987)。

それぞれの逆方向反復配列は、3つの DNA 反復配列サブユニット (需る図に三角形で示されている) を含んでおり、そのうちの2つの該サブユニットはお互いに同じ方向性を有しており、他1つのサブユニットは逆方向であつて8塩基対結合又はスベーター領域を介して他の2つのサブユニットのうちの1つに結合し

ている。このスベーター領域はユニーク Xba I 部位を有しており、PLP 遺伝子の生成物を認識しそしてその生成物によつてその末端が切斷される。それに隣接している配列は、他の逆方向反復配列に対応する配列に対して相同性を有しており、従つて末端が切斷された後に正確に組換えが行なわれる。Anders らによつて、8 b.p. スベーター領域を含む74塩基対の配列がPLP部位特異的組換えには最低限必要であることが見出された (Anders et al., 1985)。

2 μ m プラズミドの複製系に基づいた発酵ベクターは、2 μ m プラズミドの複製に必須ではない領域に異種 DNA 配列を挿入することによつて構築される (Boggs, 1981)。このようなベクターには基本的に2つのタイプがある。即ち、(i) 全 2 μ m ベクター及び(ii) 2 μ m オリジンベクターである。前者の場合には、2 μ m ベクターの全てを有しており、そこには *coli* プラズミド DNA などの各種の異種配列が挿入されている。このように挿入されたプラズミドは、*Clr*⁺ (2 μ m 含有) 及び *Clr*⁻ (2 μ m 欠損) 宿主のいずれにおいても、高い遺伝的安定性を有しており高いコピー数で維持される。他方後者の2 μ m オリジンベクターは、通常、2 μ m の DNA 複製オリジンと2 μ m の5'9'端逆反復配列のシングルコピーを有する最少 DNA 配列を持つのみであつて、このようなベクターは *Clr*⁺ 宿主株でしか維持できない。何故なら、安定に維持されるためには、

これらのベクターは、内因性のプラズミドの REP 1 及び REP 2 遺伝子によつてコードされる蛋白質をトランス作用蛋白質として用いる必要があるためである。

異種遺伝子を発現して商業的に重要なポリペプチドを高レベルで産出することのできる遺伝子的に修正された酵母を構築する場合には、通常、高コピー数の酵母ベクターを選択することが望ましい。2 μ m 由来ベクターは発現プラズミドとして用いるには非常に好適であることが証明されており、今日ではしばしば2 μ m 由来ベクターが用いられている (Eliasson et al., 1983)。

欧州特許出願第8430303号、1 (公開番号0201237A1、出願人ゲルマ・バイオテクノロジー Ltd) には、最初のビール発酵時期には異種遺伝子の発現が起こらず、酵母の量が蓄積されその後ビールから酵母を取り出すと異種蛋白質の合成が誘導されるように、工業用酵母株を遺伝子的に修正して発酵用酵母中で異種蛋白質を産生する方法が記載されている。かかる方法は、塩力を選択マーカー CUP - 1 と修正した血清蛋白質 N - メチオニルアルギニン (Met - HBA) をコードする遺伝子とを有する2 μ m 由来ベクターであつて該蛋白質の発現がガラクトース誘導プロモーターによつて転写レベルで調節されているベクターで、発酵用酵母を形質転換することによつて達成される。上記の方法の実施段階中に、異種蛋白質の合成量を

最大にするためには次のことを実施するのが必要である。即ち、(i) 発現される遺伝子 (Met - HBA をコードする) の高コピー数；(ii) 非選択的な培養条件下において目的とする遺伝子の遺伝的安定性が高いこと；(iii) 発酵用酵母に導入される組換え遺伝子は、酵母及び該酵母のビール並びに異種蛋白質の生産能に有害な効果を与えないこと；及び(iv) 酵母中に存在する組換え遺伝子は、出来る限り、目的する遺伝子及びそれに隣接する調節遺伝子に属すべきであること、である。上記図は特に重要であり、通常の発酵用酵母の培養メディアム、即ちポンプが添加された麦芽抽出物に銅イオンなどの毒性物質を添加することは望ましくなくまた実用的でない。銅イオンを添加する場合には、工程コストが上昇し、第1の発酵生産物であるビールの質に有害で許容し得ない効果を与えることになる。上記図に關しては、遺伝子的に修正された酵母は、組換えプラズミドのバクテリア由来の配列部分に短縮する配列などの余分な DNA 配列を有していないのが望ましい。

本発明書の出願であつて EP - A - 251744 として公開された特許書には、目的する DNA 配列を含有する相同性2 μ m プラズミド DNA 配列の2つのコピーが同じ方向性を有しているインテグレイトベクターを構築し、このベクターで酵母を形質転換し、次いで得られる形質転換酵母から、目的とする DNA 配列が導出されて修正された内因性2 μ m プラズミドを維持する

細胞を単離することによつて、内蔵性 2 μ m プラスミドを目的とする遺伝子又はペプチドをコードする DNA 配列を導入して、酵母細胞を修正する方法が記載されている。インテグレイトベクター自体は、形質転換酵母細胞中で存続できない。相同性 2 μ m プラスミド DNA 配列は、通常はそうではないが、2 μ m プラスミド反復配列のコピーであつてもよい。

本発明者は、修正された 2 μ m プラスミドを導入することによつて酵母細胞を形質転換することのできる、上記明細書に記載された方法の改良を見出した。

本発明の方法では、使用するプラスミドベクターは、2つの同じ方向性を有している相同性 2 μ m プラスミド DNA FLP 組換え部位の間に導入されているパタリファ中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列、目的とする遺伝子又はペプチドをコードする DNA 配列であつて必ずしも必要ではないが好ましくは酵母に対して異なる DNA 配列、及び好ましくは選択マーカー DNA 配列を含むベクターである。本発明の 2 μ m プラスミドベクターは、FLP 組換え部位のうちの 1 つのコピーを有しており、その 1 対は同じ方向性を有しており、他の 2 対は逆の方向性を有している。このような構成を有するプラスミドベクターで酵母を形質転換すると、パタリファ中でのベクターの増殖を可能にする DNA 配列は自然に失われ、プラスミドベクターは、形質転換酵母の内蔵性 2 μ m プラスミドと置換し得る修正 2 μ m プラスミド

となる。この種のプラスミドベクターを以後ダイスイントグレイションベクターという。このようなベクターで形質転換された酵母は、目的とする遺伝子を含むパタリファ DNA は含まない修正 2 μ m プラスミドの多数の染色体外コピーを有しており、これらは非選択的生育条件下において遺伝的に安定に継承されることが見出されている。

1984 年秋の第 13 回目の「酵母遺伝子及び分子生物学」についてのコンフェレンスで、Bruschi は、2 μ m 由来プラスミドの組換えによつてパタリファ DNA 配列が除去されることを報告したが、それは、その系が DNA 分子の構造と機能との関係を研究するのに用いることができることを示唆したにすぎない。本発明者は、同様の系が、予期せぬ安定性を有する有利な発現ベクターの構築に用いることができることを見出した。

本明細書で用いる「FLP 組換え部位」とは、FLP 遺伝子生産物との相互作用の結果、組換えが可能な部位のいずれをも意味する。もし Andrew らの知見(1985)が正しいならば、FLP 組換え部位は、通常彼らによつて同定された 74 bp 配列をその最少配列として有している。実際は、全反復配列の 599 塩基対以上を含んでいたとしても何んらの特異もない。

本発明の 2 μ m 由来ダイスイントグレイションベクターは、実験室及び工業用のいずれの酵母も形質転換できるとが提出された。このベクターは、細胞 1 個当たり高コピー数で維持され且つ非常に高い遺伝的安定性を有している。更に、これまで報告されている他の 2 μ m 由来ベクターと異なつて、本発明のダイスイントグレイションベクターは、酵母が形質転換される際に、パタリファプラスミド DNA 配列が自然に除去されるように構築されている。かくして、2 μ m プラスミドに導入された目的とする遺伝子が、非選択的生育条件下においても永分なパタリファプラスミド DNA 配列が存在することなく細胞 1 個当たりのコピー数が高い状態で維持される発現用酵母の遺伝子的修正株が構築できる。このようなベクターを用いて遺伝子的に修正された発現用酵母を構築することにより、目的とする遺伝子のみが発現用酵母の後の世代まで安定に維持され、これによつて、付加的な DNA 配列が酵母の挙動及び／又は酵母によつて産生される物質の蓄り並びに汚染に与える有害な効果を除去できる。

実際には、目的とする遺伝子はいずれの組換え遺伝子であつてもよく、また酵母に対して異なるものでも同様のものでもよい。本発明のダイスイントグレイションベクターは例えば、発現用酵母に MEL-HSA 遺伝子を安定にインテグレートするのに用いることができ、この遺伝子は、例えば EP-A-~~201239~~¹⁴⁷¹⁹⁸ 号明細

書に記載された方法に従つてホスホグリセレートキナーゼプロモーター (PGK) により、あるいは例えば EP-A-201239 号明細書に記載された GAL10 / CYC1 ハイブリッドプロモーターあるいは EP-A-258067 号明細書に記載された GAL / PGK プロモーターなどの調節可能なプロモーターによつて発現される。

本発明の系によつて安定に維持される付加的な遺伝子は、例えば、発酵用酵母での細胞外グルコアミラーゼ酵素の産生を規定する *Saccharomyces diastaticus* の EX1 遺伝子、発酵用酵母でのエンド-1,2-1,4- β -グルカンナーゼの産生を規定する *Bacillus subtilis* の β -グルカンナーゼ遺伝子 (Hinchliff & Box, 1985) などである。このような遺伝子は、遺伝子の発現レベルをコントロールし及び／又は遺伝子によつて産生される蛋白質が発現用酵母から分泌されるように、最初に遺伝子的に修正することができる。

本発明の新しいダイスイントグレイションベクターは、EP-A-201239 号明細書に記載された工程に用いるのが特に有利である。なぜなら、この工程によれば、目的とする遺伝子はビール発酵の間は発現されずまた酵母の通常の生育条件下でも発現されず、発酵後の工程で発現されるように調節されているためである。従つて、目的とする遺伝子の高レベル発現の

時期と、細胞増殖によつて酵母のバイオマスが合成される時期とが分離されており、これによつて、プラスミド安定性及び遺伝子発現の影響を最少にすることが出来る。

本発明のベクターは、(i)バクテリア宿主中でこの当該ベクターの増殖に必要なバクテリアプラスミドDNA配列；(ii)エキストラ2nd FLP組換え部位；(iii)目的とする蛋白質又はペプチドをコードするDNA配列；及び(iv)酵母形質転換用の選択マーカーDNA配列を有する完全2nd FLPプラスミドを含むダイスインテグレーションベクター（前記定義の通り）であつて、2nd FLPプラスミドの2つの逆方向反復配列の1つの配列内の制限酵素部位に該バクテリアプラスミドDNA配列が挿入した二重エキストラ2nd FLP組換え部位が作成されており、該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位に対して同じ方向性を有して該エキストラFLP組換え部位が存在しており、該エキストラFLP組換え部位と該逆方向反復配列の1つの配列内の内因性FLP組換え部位との間に該バクテリアプラスミドDNA配列がはさまれているダイスインテグレーションベクターが好ましい。

このような本発明の好ましいダイスインテグレーションベクターは、1つもしくはそれ以上のバクテリアプラスミドDNA配列と、2nd FLPプラスミドから得られる74塩基対FLP組換え部位のエキストラコピーとが

挿入された完全2nd FLPプラスミドからなる。更に、酵母形質転換用の選択マーカー例えばCUP-1と共に無効にせんだ目的とする遺伝子が、2nd FLPプラスミドの第2の部位に挿入されている。バクテリアプラスミドDNA配列と酵母DNA反復配列とが、完全2nd FLPプラスミドの2つの逆方向反復配列の1つのコピー内の例えばXbaI部位に挿入されている。DNA反復配列の正しい方向は、プラスミドの機能に必須であり、例えばE. coliでの増殖に必要なバクテリアプラスミド配列は、2nd FLPプラスミドのFLP組換え部位の同じ方向性を有する2つのコピーの間には置かれるようにプラスミドが複製される。DNA配列の配置は、第3図に詳しく説明されている。このように複製することによつて、プラスミドを酵母に導入した時に2つの同じ方向性を有するDNA反復配列の間で生じる部位特異的組換えによりプラスミドから除かれるようにDNAの領域内に、バクテリアプラスミドDNA配列を配置することが出来る。この部位特異的組換えは、2nd FLPプラスミドのFLP遺伝子産物によつて仲介され、この産物は、*cir⁺* 細胞を形質転換した場合には酵母の内因性2nd FLPプラスミドによつて供給され、*cir⁻* 細胞を形質転換した場合にはダイスインテグレーションベクター自身によつて供給される。本発明のベクターは、形質転換酵母の内因性2nd FLPプラスミドを補うのに使用することができ、また組換えは*cir⁺* 細胞の方が速く起こる

ことから、本発明のベクターは完全2nd FLPプラスミドに書くのが好ましい。しかしながら、本発明のベクターが内因性2nd FLPプラスミドと共に存在する場合に、該ベクター中にないREP 1, REP 2, REP 3, FLPなどの遺伝子は、これら遺伝子の産物であるトランス作用蛋白質として供給される。これらのすべては複製のオリジンに必要なものである。

以下に詳述するように、バクテリアDNA配列を有する挿入用DNA配列は、そのそれぞれの末端に反復配列のそれぞれの部分を保持していてもよく、この場合には該挿入用DNA配列は、内因性組換え部位が破壊されて時に2つの新しいFLP組換え部位が形成されるように内因性反復配列内に挿入され、このFLP組換え部位はそれぞれ内因性組換え部位と挿入された挿入用DNAの相補的部分とからなっている。あるいはまた、完全なFLP組換え部位を挿入用DNA配列の一部に導入し、次いで得られるDNA配列を、バクテリアDNA配列が内因性反復配列と挿入用反復配列との間に存在するように、内因性反復配列に隣接して又は離れて挿入される。挿入用DNA配列が、内因性反復配列から離れた位置に挿入される場合には、内因性反復配列と挿入された反復DNA配列との間の内因性DNA配列はバクテリアDNA配列とともに消滅される。従つてこのDNA配列が必要な場合には、挿入用反復配列の内因性反復配列から離れた何れ（好ましくは挿入されるDNA配列上に）

更にこのDNA配列の1つのコピーを置く必要がある。

目的とする遺伝子を挿入するインテグラル2nd FLPプラスミドの部位は、該挿入によるプラスミドコピー数及び遺伝的安定性への効果が最少になるように選択される。従つて、REP 1, REP 2, REP 3及びFLP遺伝子に対して害を与えないような部位に目的とする遺伝子を挿入するのが好ましく、特に、プラスミドを酵母の*cir⁺* 細胞株の形質転換に用いる場合にはそのようにするのが好ましい。

本発明のダイスインテグレーションベクターの1つの有利な特徴点は、それを*cir⁺* 酵母株に導入した場合にはそれがインテグラル2nd FLPプラスミドを喪失しているためにバクテリアプラスミド配列が除去される間または除去された後にそれが内因性2nd FLPプラスミドを補うことができることである。同様の状態については酵母の*cir⁺* 細胞株に導入された完全2nd FLPベクターについても報告されている（Harford & Petráň, 1987）。本発明のダイスインテグレーションベクターは、酵母株の内因性2nd FLPプラスミドを補うために用いることもできる。

添付した図面においては以下のことが示されている。

図1図は、プラスミドpDA 112（Andersén, et al., 1985）を示す。細い線は、バクテリアプラスミドpUC9から誘導されるDNA配列を示し、太い無効の図は、FLP組換え部位を含む74塩基対DNAフラグメ

ントを示し、三角形は、それぞれのFLP感受性部位のうちの内部DNA反復配列の方向を示す（Andrews, et al., 1985）。

第2図は、プラスミドpSAC 112を示す。プラスミドpSAC 112は、BamHI、PstI及びHindIII部位が除かれている以外はpBA 112と同じである。

第3図は、プラスミドpSAC 3を示す。太い線は、バクテリアプラスミドpUC9のDNA配列を示し、太い直線の囲いは、FLP感受性部位を含む74塩基対DNAフラグメントを示し、細い線は2 kbプラスミドDNA配列を示し、三角形は、それぞれのFLP感受性部位のうちの内部DNA反復配列の方向を示す。

第4図は、プラスミドpSAC 3U1を示し、記号は第3図と同じである。

第5図は、pSAC 3U2のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第6図は、pSAC 3U0のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第7図は、pSAC 310のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第8図は、pSAC 301のプラスミドマップを示し、記号は第3図と同じである。

第9図は、半数体母体の生育を示す実験に要した図面であり、URA 3及びバクテリアbla遺伝子の遺伝的安定性を示す。

Xba Iで開裂したpSAC 112に連結した。連結して得られるDNAをE. coli株AB1（NBL Enzymes Ltd., Crawlington, Englandから入手した）に導入した。得られるアンプシリン耐性の形質転換体について、プラスミドpUD92（Storms, R.K. et al., 1977）から得た³²Pラベル化2.2 kb塩基対EcoRIフラグメントとのコロニーハイブリダイゼーションにより（GrundsteinとKogness, 1975）、2 kbプラスミドに対する相同性をスクリーニングした。2 kbプラスミドに特異的なDNAプローブに対して種同性を示すコロニーを単離し、そのプラスミドDNAを制限酵素Xba Iで消化し、ゲルから単離した。かくしてプラスミドpSAC 3を得た。

プラスミドpSAC 3を制限酵素Pst Iで開裂することによって、プラスミドpSAC 3U1（第4図）及びpSAC 3U2（第5図）を構築した。線状DNAを、0.3 mM dNTP（dATP, dTTP, dCTP及びdGTP）の存在下で70℃で10分間、T₄ DNAポリメラーゼで処理してプラント末端とした。DNAをフェノール：クロロホルムで抽出し、リガーゼを行なう前にエタノール沈殿処理した。プラスミドpUD91（Geggs, 1981）を、制限酵素Hind IIIで消化し、DNAフラグメントを100ゲルのアガロースゲル電気泳動に付した。酵素のURA 3遺伝子を有する1.1 kb塩基対DNAフラグメントをゲルから単離し（Maniatis, et al.,

第10図は、³²Pでラベル化したpSAC 3 DNAでプローブした全酵母DNAのオートラジオグラフィーを示す。

以下に、本発明を実施例により説明する。

実施例1

プラスミドの構築

プラスミドpBA 112（第1図, Andrews, et al., 1985）を、制限酵素BamHI及びHind IIIで同時に消化することによってプラスミドpSAC 112（第2図）を構築した。線状プラスミドDNAを、0.3 mM dNTP（dATP, dTTP, dCTP, 及びdGTP）の存在下で70℃で10分間、DNAポリメラーゼI（クレノー）で処理した。DNAをフェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿し、次いでT₄ DNAリガーゼの存在下で150℃で1晩インキュベートした。連結されたDNAをE. coli株MC1061（CasadabanとCohen, 1980）に導入し、得られる形質転換体からプラスミドpSAC 112を単離し、BirboimとDoly（1980）の方法によって同定し増幅を行なった。

以下のようにしてプラスミドpSAC 3（第3図）を構築した。Quirindes, et al.,（1974）に記載された方法と同様にしてBRI 9株から、酵母2 kbプラスミドDNAを単離した。複製した2 kbプラスミドDNAを、Maniatis, et al.,（1982）に記載された方法と同様にして、制限酵素Xba Iで部分消化し、

1982）、0.3 mM dNTP（dATP, dTTP, dCTP及びdGTP）の存在下でDNAポリメラーゼI（クレノー）で処理した。1.1 kb塩基対Hind IIIフラグメントをフェノール：クロロホルムで抽出し、エタノール沈殿処理し、上記で複製した線状pSAC 3 DNAとプラント末端で連結した。得られる連結DNAをE. coli株AB1に導入した。得られるアンプシリン耐性形質転換体について、プラスミドpUD91から複製される1.1 kb塩基対Hind IIIフラグメントの³²Pラベル体を用いたコロニーハイブリダイゼーションにより

（GrundsteinとKogness, 1975）、URA 3遺伝子に対する相同性をスクリーニングした。URA 3遺伝子プローブに対して種同性を示すコロニーから、プラスミドpSAC 3U1（第4図）及びpSAC 3U2（第5図）を単離した。また、URA 3遺伝子を含有1.1 kb塩基対Hind III DNAフラグメントを、pSAC 3のニードBamHI部位及びSnaBI部位にプラント末端で連結して、pSAC 3U0（第6図）及びpSAC 310（第7図）と命名されたプラスミドをそれぞれ得た。

プラスミドpST 1311（Henderson, et al., 1985）から得られるCUP 1遺伝子を保持する694塩基対Xba I・Xba I DNAフラグメントを、pSAC 3のニードPst I部位へプラント末端で連結することによって、プラスミドpSAC 301（第8図）を構築した。

プラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 による酵母の形質転換

ダイスインテグレーションベクター pSAC 3U1 (第4図) 及び pSAC 3U2 (第5図) は、2 kb のフォームのユーク Pet 1 部位に挿入された選択母遺伝子 URA⁺ をそれぞれ含むように構築されている。更にはそれぞれのプラスミドは、同じ方向性を有する FLP 置換え部位の2つのロゼーに接しているバクテリアプラスミド pUC 9 から得られる DNA 配列を保持している。pUC 9 DNA の位置は、これらの同じ方向性を有する2つの FLP 置換え部位の間での FLP を介しての置換えが起これ、その結果、酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA が除去されるような位置にある。Lio (1988) の方法に従って、プラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 で、半親体酵母株 S 150 + 2 の *cir⁺* 及び *cir⁰* 誘導体株 Caspore, et al., 1986) を形質転換してクラシル原株株とした。得られる URA⁺ 形質転換体について、Chevalier と Aigle (1979) の方法により、酵母での *θ*-ラクタム特異的酵素 *θ*-ラクタマーゼをコードするバクテリア *bla* 遺伝子の遺伝的継承性をスクリーニングした。第9図にその結果が示されており、それによれば、両者のプラスミドは、全ての *cir⁰* 株の形質転換体において URA⁺ 遺伝子から *bla* 遺伝子を分離 (*segregate*) しており、酵母の形質転換の際に、プラスミドからバクテリア DNA 配列が

除去されたことを示している。しかしながら、*cir⁺* 株の URA⁺ 形質転換体の大部分については、*bla* 遺伝子が遺伝的に継承されていることが観察された (pSAC 3U1 については20のうち15株、pSAC 3U2 については20のうち16株)。これらのデータから、プラスミドの分解、即ち FLP によるバクテリアプラスミド DNA 配列の除去は、*cir⁺* 株よりも *cir⁰* 株の形質転換の際により多く能うことが示されている。

形質転換体の分子分析

bla 遺伝子を分離した URA⁺ 形質転換体 (即ち、*θ*-ラクタマーゼ・ネガティブ・クローン、*bla⁺*) が、実際に *bla* 遺伝子とそれに隣接したバクテリアプラスミド DNA 配列を失っているかを調べるために、酵母 DNA を分析した。pSAC 3U1 又は pSAC 3U2 で形質転換された *cir⁺* 及び *cir⁰* 株の2つの URA⁺ *bla⁺* 形質転換体を、クラシルを含む最小増殖培養液で培養せしめて、以下に示す方法でその全 DNA を抽出した。よく洗浄した細胞を採取し、それらを、1 ml ソルビトール、0.025 M エチレンジアミン四酢酸 (EDTA) pH 8.0, 8 M / ml チオホスレイトールの 5 ml に 28℃ で15分間再懸濁した。次いで、細胞を採取し、1.2 M ソルビトール、0.1 M 塩酸ナトリウム、0.01 M EDTA pH 8.0, 0.025 M / ml サイリナーゼ (キリンゼール, Co. Ltd.) の 5 ml に 28℃ で、プロトプラストが得られるまで再懸濁した。得られるプロトプ

ラストを、1.2 M ソルビトールで再懸濁し、3 ml サルボール、0.3 M トリス / HCl pH 7.5, 0.2 M EDTA, 100 mg / ml プロテインアーゼ K の 1 ml に 55℃ で 60分間再懸濁した。クロロホルム：イソプロパノール、フェノール、クロロホルム、次いでエーテルで DNA 抽出物を抽出し、10 mM トリス / HCl, 1 mM EDTA pH 8 に対して重析した。酵母全 DNA を、制限酵素 *EcoR* I, *Xba* I 及び *Pst* I で消化し、得られる DNA フラグメントをアガロース電気泳動で分離した。サザンブロット法 (Maniatis, et al., 1982) に従い、酵母全 DNA を ³²P ラベル化 pSAC 3 DNA のハイブリダイズさせた。その結果は第10図に示されており、第10図は、³²P ラベル化 pSAC 3 DNA でプロブされた酵母全 DNA のオートラジオグラフィを示している。プラスミド pSAC 3U1 又は pSAC 3U2 で形質転換された S 150 + 2 の *cir⁺* 株から DNA を単離した。それぞれの株 / プラスミドの組合わせの2つの形質転換体を入。B と命名し、それらを分析した。DNA は次のように制限酵素で消化した。

- Xba* I : トランク 1 - 4 及び 21 - 24
- Pst* I : トランク 5 - 12
- EcoR* I : トランク 13 - 20。

トランク	プラスミド	<i>cir⁺</i> / <i>cir⁰</i>	菌株 (A/B)
0, 14, 22	pSAC 3U1	<i>cir⁺</i>	A
8, 16, 24	pSAC 3U1	<i>cir⁺</i>	B
5, 13, 21	pSAC 3U1	<i>cir⁰</i>	A
7, 15, 23	pSAC 3U1	<i>cir⁰</i>	B
2, 10, 18	pSAC 3U2	<i>cir⁺</i>	A
4, 12, 20	pSAC 3U2	<i>cir⁺</i>	B
1, 9, 17	pSAC 3U2	<i>cir⁰</i>	A
3, 11, 19	pSAC 3U2	<i>cir⁰</i>	B

酵母の内部に 2 kb プラスミドに存在する公衆の制限酵素部位 (Bartley と Donaldson, 1980) 及び置換えプラスミド pSAC 3U1 及び pSAC 3U2 に基づき、プラスミド pSAC 3 に対するハイブリダイゼーションパターンを予想することが出来る。予想されるハイブリダイゼーションパターンを表1に示した。

表 1
pSAC301 及び pSAC302 で形質転換された S150-2D^{cir+} と
cirt⁰ 誘導体の pSAC301 に対するハイブリダイゼーション

プラスミド DNA	制限酵素アフラゲメント (ナトリウム塩)	
	NotI	XbaI
2 μm (内因性)	4.1 5.9 2.4 2.2	5.2 3.1
pSAC301 及び pSAC302 (インデラト)	5.3 4.1 0.72	4.3 3.2 2.8
pSAC301 及び pSAC302 (分解した)	(5.0) 4.1 3.3 (2.4)	4.5 3.2

全ての場合において、それらの形質型が失われていることが観察された。即ち、pSAC300 及び pSAC310 は酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA を除去することができる。この点に関して、プラスミド pSAC300 の場合では、S150-2B の cirt⁺ 誘導体の dia⁺ 形質転換体が無意に高い比率で生じることが観察された。このことについてはどのように説明すべきかは判らない。しかしながら、次の可能性がある。即ち、pSAC300 に URA⁺ 遺伝子が挿入されたことによつて dia⁺ 1 単位がとれ、誘導している FLF 遺伝子の発現が障害を受け、その結果 FLF レコンビナーゼの発現が高くなつた可能性がある。

プラスミド pSAC301 を、銅感受性工業用酵母、即ち発酵用酵母の形質転換に用いることを考えた。即ち、Hisoblique と Daubney (1986) に記載されている Bas ラーガービール酵母 (B11.0) を pSAC301 で形質転換した。ないで、得られる細胞性形質転換体について、テラグラマーゼプレート法により dia⁺ 形質型が存在するかどうかをテストした。テストした形質転換体の約 1/8 が dia⁺ 形質型を示し、このことは、発酵用酵母細胞においてプラスミド pSAC301 の in vivo 分解が起つたことを示している。

プラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の in vivo 分解について、数現型が失われた適当な宿主株の分子上の特徴付けを十分に行なうことによつて分

かるべきである。分解放したプラスミドが FLF による内部消化を受けた場合に生じるフラグメントを示すものである。

ハイブリダイゼーションの結果(図 10 図)とその手順(表 1)とを比較すると、それぞれの形質転換体において、同じ方向を有する FLF 起動元部位内にあるバクテリアプラスミド DNA 配列の除去に相当する欠失を起動元プラスミドが受けたことが判る。更には、pSAC302 / 3 と命名された形質転換体の場合には、S150-2B 株の内因性 2 μm プラスミドはもはや存在していない。このことは、プラスミド pSAC302 で cirt⁺ が形質転換されることによつて内因性 2 μm プラスミドが除去されたことを示している。

更に、プラスミド pSAC301 と pSAC302 が酵母の形質転換の際にバクテリアプラスミド DNA 配列の除去を受けたことは、³²P-ラベル化 pUC9 DNA (Vieira と Messing, 1982) に対する上記した DNA 誘導物のハイブリダイゼーションからも明らかにである。URA⁺ dia⁺ 形質転換体は、この DNA プローブに対してハイブリダイズしなかつた。

酵母形質転換の際のプラスミド pSAC300、pSAC310 及び pSAC301 の分解

URA⁺ プラスミド pSAC300 及び pSAC310 を用いて、S150-2B の cirt⁺ 及び cirt⁰ 誘導体を形質転換し、得られる形質転換体の URA⁺ 及び dia⁺ 形質型を調べた。

解が生じていることを確認した。即ち、上記した ³²P-pUC9 DNA に対して酵母全 DNA をハイブリダイズさせた所、dia⁺ 誘導体株については何人らの相同性も検出されなかつた。

分解放した形質転換体のプラスミド安定性

pSAC301、pSAC302、pSAC300 及び pSAC310 の分解放したプラスミド誘導体を保持する S150-2B の cirt⁺ 及び cirt⁰ 株における URA⁺ 形質型の遺伝的安定性を、2 条 Y-バグルコースを含む YPD 中で非選択的に酵母を生殖せしめ、同じ最少増殖にプレートし、又はセウラルを欠いた最少増殖にセリカプレートすることによつて調べた。1 世代当りのプラスミド欠陥パーセントを計算し、表 2 に示した。

表 2

1 世代当りのプラスミド欠陥パーセント

プラスミド誘導体 (分解放したバグラー)	1 世代当りのプラスミド欠陥パーセント	
	S150-2B cirt ⁺	S150-2B cirt ⁰
pSAC301	0.22	0.19
pSAC302	0.31	0.14
pSAC300	2.5	-
pSAC310	0	0.89

表2の結果から判るように、すべての分解された(ダイスインテグレートされた)ベクターは、8150-28の citr^+ 及び citr^0 酵母菌株中で不変性である。しかしながら、特にpSAC3U1、pSAC3U2及びpSAC3I0の不変性レベルは、8150-28中での他のURA⁺2 μ 酵母菌株ベクター(Deaswote, et al., 1986)よりも少なくともワンオーダー低い。

pSAC3の2 μ プラスミド部分のユニークEag I部位にURA3遺伝子を挿入することによって、pSAC3U1、pSAC3U2及びpSAC3I0から新導される分解されたプラスミド酵母体よりも安定性が低い分解されたプラスミド酵母体が得られることは推定される。従つて、選択マーカーの挿入部位が、得られる分解されたプラスミド酵母体の安定性に対して大きな効果を与えることが明らかである。この点に関して、2 μ プラスミドのユニークSma I及びPst I部位が選択遺伝子の導入に用いた遺伝子組を形成することが明らかである。何故なら、このような部位への導入によつてプラスミドの安定性が影響を受けるからである。

酵母細胞の“分裂”形成酵母体でのプラスミド安定性

SA 11.0のpSAC3C1形成酵母体の分解されたプラスミド酵母体を有する分裂形成酵母体について、酵母体複製型の安定性を調べた。上記したと同様にしてプ

ている(Rose et al., 1984)。このSma I部位を、適当な目的とする遺伝子を挿入するための遺伝子座として用いることができる。

目的とする遺伝子を直接的にあるいは間接的に挿入するために(例えばURA遺伝子を挿入し、次いでそのSma I部位に目的とする遺伝子を挿入するような場合)Sma I部位を用いることが望ましいか否かは、ベクターの分解に依つている。即ち、パナクリアDNA配列の終端に依つており、このことが本発明の他の1つの局面を形成している。一般に、挿入された遺伝子から約12 kb領域、特に酵母の複製オリジン(ori)から離れたSma I部位側のSTB領域まで転写が行われるのを止めるのが望まれている。従つて、挿入される配列は、(a)目的とする遺伝子、(b)そのori領域に隣接した部位上にあるプロモーター及び(c)目的とする遺伝子の下流であつて血つ目的とする遺伝子とSTB領域との間にあるターミネーターからなるのが好ましい。

引用文献

- Aigle et al., (1984), Journal of the American Society of Brewing Chemists, 42, 1.
 Andrews et al., (1985) Cell, 40, 795.
 Boggs, (1978), Nature, 273, 104.

プラスミド安定性の実験を行った際、非選択的培養条件下で1世代当たり0.014%のプラスミド欠損が観察された。この結果から、pSAC3C1の分解されたプラスミド酵母体は酵母菌株SA 11.0中で非常に安定であり、極めて2 μ 酵母菌株ベクターについてこれまで観察されたことのない程度の安定性を有している。

酵母中で目的とする遺伝子を安定に維持するためにダイスインテグレーションベクターを能動すること

プラスミドpSAC3はユニークPst I部位及びユニークSma I部位を有しており、これらのいずれにDNA配列を挿入しても、酵母でのプラスミドの分解酵母体の複製型の安定性に別して悪い影響を及ぼさず、DNA配列を挿入することができる。これらの部位は、目的とする遺伝子、例えば8, diacetateのDEX-1遺伝子及び酵母プロモーターで発現されるヒト血清アルブミン遺伝子の導入のための遺伝子座として用いることができる。公知の方法を用いて、酵母形成酵母体の選択マーカーとともにこのような遺伝子をこのようなユニーク遺伝子座に挿入することができる。あるいは、プラスミドpSAC3U1、pSAC3U2、pSAC3I0及びpSAC3C1は、目的とする遺伝子を挿入するための酵母体として用いることができる。この点に関して、プラスミドpSAC3U1、pSAC3U2及びpSAC3I0は、URA3遺伝子の3'非翻訳領域にユニークSma I部位を有し

Boggs, (1981), In: "Molecular Genetics in Yeast," Alfred Benzon Symposium No: 16, Munksgaard, Copenhagen.

Birnboim & Doly, (1980), Nucleic Acids Research, 7, 1513.

Bokivar, (1978), Gene, 4, 121.

Bovstein & Davis, (1982), In "The Molecular Biology of the Yeast, Saccharomyces: Metabolism and Gene Expression", Eds. Strathern et al., Cold Spring Harbour Laboratory, New York.

Broach & Hicks, (1980), Cell, 21, 501.

Casadaban & Cohen, (1980), Journal of Molecular Biology, 138, 179.

Cashmore, et al., (1986), Molecular and General Genetics, 203, 154.

Chevallier & Aigle, (1979), FEBS Letters, 106, 179.

Chevallier, et al., (1980), Gene, 11, 11.

Clarke & Carbon, (1980), Nature, 287, 504.

- Clark-Walker & Miles, (1974), European Journal of Biochemistry, 41, 359.
- Cohen et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 1078.
- Falco & Dumes, (1985), Genetics, 109, 21.
- Futcher, (1986), Journal of Theoretical Biology, 119, 197.
- Futcher & Cox, (1983), Journal of Bacteriology, 154, 612.
- Gerbaud et al., (1979), Gene, 5, 235.
- Grise et al., (1983), Gene, 25, 178.
- Grunstein & Hogness, (1975), Proceedings of the National Academy of Sciences USA, 72, 3961.
- Guariseau, et al., (1974), Biochemical Biophysics Research Communications, 61, 462.
- Hadfield, et al., (1986), Gene, 45, 149.
- Harford & Casare, (1985), DNA, 4, 80.
- Harford & Peters, (1987), Current Genetics, 11, 316.
- Kingsman, et al., (1983), Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 3, 377.
- Livingston, (1977), Genetics, 86, 73.
- Livingston & Hahne, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 3727.
- Mandiao et al., (1982), In: "Molecular Cloning: a Laboratory Manual", Cold Spring Harbour, New York.
- Murray et al., (1987), The EMBO Journal, 6, 4205.
- Nelson & Fangman, (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 6515.
- Newton, et al., (1981), IGN-UCLA Symposium on Molecular and Cellular Biology, 22, 501.
- Orr-Weaver, et al., (1981), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 78, 6334.
- Orr-Weaver, et al., (1985), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 228, Academic Press, New York.
- Rine, et al., (1983), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 80, 6750.
- Rose et al., (1984), Gene, 29, 133.
- Rothstein, (1983), In "Methods in Enzymology", Eds. Wu, et al., 101, 202, Academic Press, New York.
- Selig et al., (1980), Nucleic Acids Research, 8, 3371.
- Sigurdson et al., (1981), Molecular and General Genetics, 183, 59.
- Som et al., (1986), Cell, 52, 27.
- Storms, et al., (1979), Journal of Bacteriology, 140, 73.
- Struhl et al., (1979), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 76, 1035.
- Taketo et al., (1980), Proceedings of the National Academy of Sciences, USA, 77, 5144.
- Tubb, (1980), Journal of the Institute of Brewing, 86, 78.
- Vieria & Messing, (1982), Gene, 19, 239.

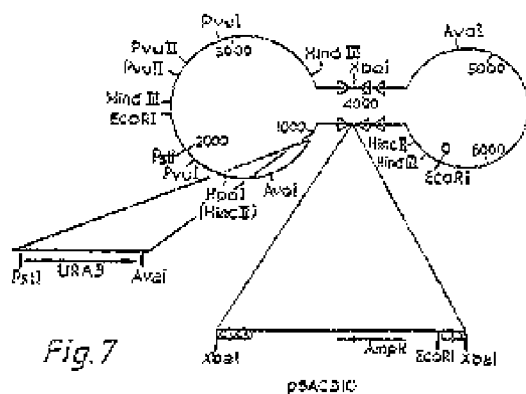


Fig. 7

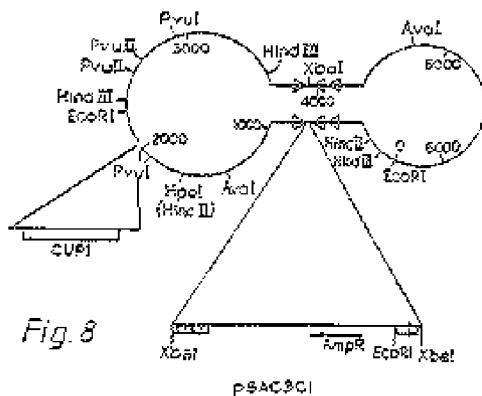


Fig. 8

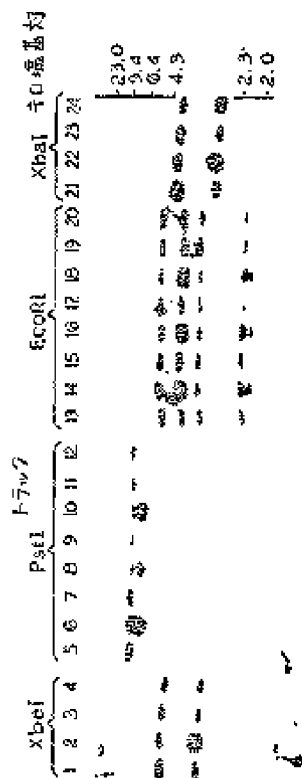
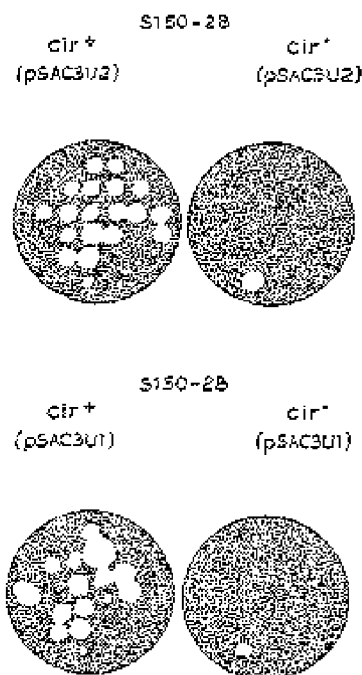


Fig. 10

[illegible]

14-00000-70 CONTINUED TO BE NECESSARY (CONTINUED FROM THE SECOND SHEET)		Page 1 of 1
Account	Comments	Amount
A	27. A. 0147198 (KASH PUBLIC LTD) 3 July 1988, see 0147198; page 11, line 23 - page 28, line 14	9

Page 48T de 52: HRP2 et HRP41 (HPV) 1/61

The names take on special significance in the light of the fact that it was the same individuals who had been the mainstay of the business since Olan and his brother had founded it. The business passed Olan's hands and came to rest particularly with the family given the the nature of the business.

Person's date of birth (month - day - year)	Person's SSN	Person's date of birth (month - day - year)	Person's SSN
EP=A 020329	12-11-86	GA=A 217529	01-11-86
		JP=A 612820	12-18-80
		CU=A 484836	06-11-87
WA=A 670500	21-05-87	GU=A 617283	04-06-87
		SA=A 624543	19-11-87
EP=A 018719	05-07-86	AF=A 370434	18-07-85
		JA=A 002306	08-12-86

1999

For more general access, users : see *Critical Journal of the Canadian Patent Office*, p. 824

第1頁の続き

優先權主張

發明者

©1987年8月3日©イギリス(GB)©8718347

チネリイ、シモン アンドリュ

イギリス国 エヌジ-13 シーティー、ノッティンガムシャー、
ビンガム、マスターズ ロード、4